

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-322569

(43)Date of publication of application : 10.12.1996

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
C07H 21/04
C12Q 1/68

(21)Application number : 07-158665

(71)Applicant : SHIMADZU CORP

(22)Date of filing : 31.05.1995

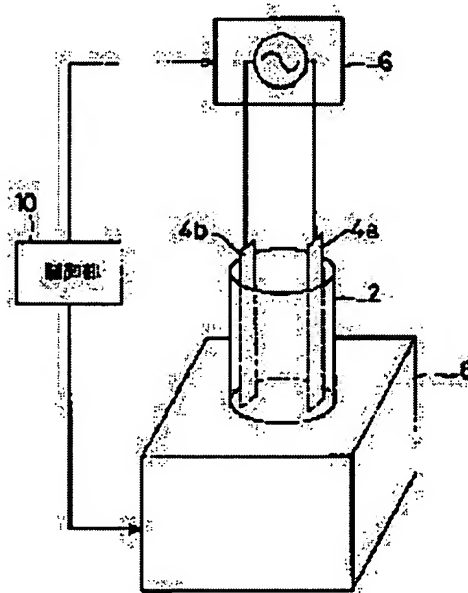
(72)Inventor : HAZAMA HAJIME

(54) DUPLICATION OF DNA

(57)Abstract:

PURPOSE: To increase the reaction speeds of an annealing reaction of a template DNA with a primer and a synthetic reaction for extending a base sequence from the primer.

CONSTITUTION: A pair of electrodes 4a and 4b are placed in a reaction vessel 2 for storing a reaction solution. A specific degree of voltage of an alternating, a direct or a pulse state is applied between both the dipoles 4a and 4b by a high voltage-generating apparatus 6, applying a specified electric field on the reaction solution stored in the reaction vessel 2. A base which the reaction vessel 2 is placed on is consisting of a temperature-controlling block 8, and this heats the reaction solution in the vessel 2 up to a specified temperature. A controlling part 10 controls the heating of the reaction solution by the temperature-controlling block 8 and the voltage applied by the high voltage-generating apparatus 6. The application of the electric field to the reaction solution makes single strand DNAs in the solution linear, which enables the smooth proceeding of an annealing reaction and a synthetic reaction.



LEGAL STATUS

THIS PAGE BLANK (USPTO)

[Date of request for examination]	23.02.2001
[Date of sending the examiner's decision of rejection]	01.03.2005
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]	
[Date of final disposal for application]	
[Patent number]	3721603
[Date of registration]	22.09.2005
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]	2005-05646
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]	31.03.2005
[Date of extinction of right]	

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-322569

(43) 公開日 平成8年(1996)12月10日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09		9162-4B	C 1 2 N 15/00	A
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 1 2 Q 1/68		9453-4B	C 1 2 Q 1/68	A

審査請求 未請求 請求項の数1 F D (全 3 頁)

(21) 出願番号 特願平7-158665

(22) 出願日 平成7年(1995)5月31日

(71) 出願人 000001993

株式会社島津製作所

京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地

(72) 発明者 狭間 一

京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地

株式会社島津製作所三条工場内

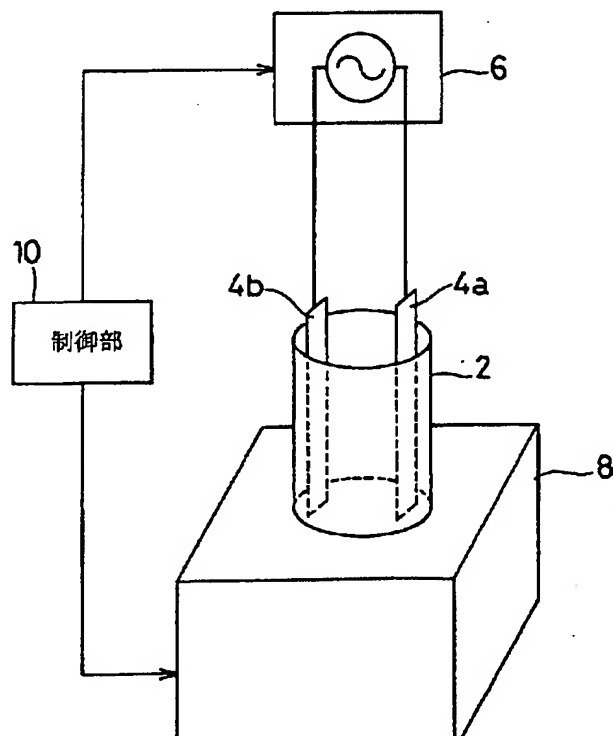
(74) 代理人 弁理士 野口 繁雄

(54) 【発明の名称】 DNAの複製方法

(57) 【要約】

【目的】 アニーリング反応や合成反応の反応速度を高める。

【構成】 反応溶液を収容する反応容器2内には一対の電極4aと4bが対向して配置され、両電極4a、4b間に高電圧発生装置6によって所定の大きさの交流、直流又はパルス状の電圧を印加し、反応溶液2に収容された反応溶液に所定の電界を印加する。反応容器2が置かれる基台は温調ブロック8となっており、反応容器2内の反応溶液を所定の温度に加熱する。制御部10は温調ブロック8による温度制御と高電圧発生装置6による印加電圧とを制御する。反応溶液に電界が印加されることにより、その中の一本鎖DNAが直線状になり、アニーリング反応や合成反応が円滑に進むようになる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 反応容器に鋳型DNA、プライマー、4種類のデオキシヌクレオチド三リン酸及び合成酵素を少なくとも含む反応溶液を収容し、所定の温度に加熱してDNAを複製する方法において、一本鎖になった鋳型DNAにプライマーを結合させるアニーリング反応工程、及びプライマーからDNA鎖を伸長させる合成反応工程では、前記反応溶液に電界を印加して鋳型DNAを直線状にすることを特徴とするDNAの複製方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はDNAの塩基配列を決定するシーケンス法や、DNA試料を増量するPCR（ポリメラーゼ・チェーン・リアクション）において、鋳型DNAの一部の長さにわたり又は全長にわたって複製する方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 シーケンス法やPCRにおけるDNAの複製は、通常以下の手順で行なわれる。（1）鋳型DNAをアルカリや熱を用いて1本鎖DNAにするディネーチャー（熱変性）工程。

（2）その一本鎖DNAにプライマーを結合させるアニーリング工程。

（3）DNA合成酵素により、鋳型DNAの塩基配列に対し相補的な塩基配列となるように、プライマーから4種類のデオキシヌクレオチド三リン酸を反応させてプライマーからDNA鎖を伸長させていく合成反応工程。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 ディネーチャー工程により一本鎖になったDNAは、通常の状態ではまっすぐに伸びた状態にはなっておらず、糸が丸まったような屈曲した立体的な形状になっている。そのような屈曲した形状は、アニーリング反応や合成反応を阻害する。そこで、本発明はアニーリング反応や合成反応の工程では、1本鎖鋳型DNAを直線状に伸ばすことによって、反応速度を高めることを目的とするものである。

【0004】

【課題を解決するための手段】 反応容器に鋳型DNA、プライマー、4種類のデオキシヌクレオチド三リン酸及び合成酵素を少なくとも含む反応溶液を収容し、所定の温度に加熱してDNAを複製する方法において、本発明では一本鎖になった鋳型DNAにプライマーを結合させるアニーリング反応工程、及びプライマーからDNA鎖を伸長させる合成反応工程では、反応溶液に電界を印加して鋳型DNAを直線状にした状態で反応を行なわせる。

【0005】 反応溶液に印加する電界は、直流、交流又はパルス状のいずれでもよく、その大きさは電気分解を

なったのを顕微鏡で確認しながら適当な大きさに設定する。またアニーリング反応や合成反応の妨げになるような低周波の交流電界も避ける。反応溶液に印加する電界の一例は、周波数1MHz程度、電界10⁶V/m程度である。

【0006】

【作用】 反応溶液に適当な大きさの電界を印加すると、屈曲して複雑な立体構造をとっていた1本鎖鋳型DNAが直線状になる。それにより、プライマーのアニーリング反応やその後の合成反応が進行しやすくなる。

【0007】

【実施例】 図1に本発明を実施する装置の一例を示す。反応溶液を収容する反応容器2は円筒状で、例えば樹脂製である。反応容器2内には一対の電極4aと4bが対向して配置され、両電極4a、4b間に高電圧発生装置6によって所定の大きさの交流、直流又はパルス状の電圧を印加し、反応溶液2に収容された反応溶液に所定の電界を印加する。反応容器2が置かれる基台は温調ブロック8となっており、反応容器2内の反応溶液を所定の温度に加熱する。制御部10は温調ブロック8による温度制御と高電圧発生装置6による印加電圧とを制御する。

【0008】 温調ブロック8による温度制御は、ディネーチャー、アニーリング反応及び合成反応の各工程ごとに所定の温度と時間を設定しておき、その設定した条件にしたがって反応溶液を加熱する。制御部10はマイクロコンピュータやパーソナルコンピュータなどを使用することができ、温調ブロック8による反応の各工程での温度と時間、高電圧発生装置6による印加電圧、及び反応の3工程を含むサイクルの繰返し回数を予め設定しておき、その設定した条件にしたがって複製反応を行なわせる。

【0009】 この反応装置を用いてシーケンス法におけるDNA複製の方法について説明する。反応容器2内には、反応溶液として鋳型DNA、プライマー、A（アデニン）、G（グアニン）、C（シトシン）、T（チミン）の4種類の塩基のデオキシヌクレオチド三リン酸、A、G、C、Tのうちの1種類の塩基のダイデオキシヌクレオチド三リン酸、合成酵素及び緩衝液などを含んでいる。その反応液に対し、制御部10により温調ブロック8を制御して反応の各工程（ディネーチャー、アニーリング及び合成）の温度と時間とを制御する。その各工程の条件は既に確立されたものであり、その一例を示すと以下のごとくである。

ディネーチャー : 95℃, 30秒

アニーリング : 50～60℃, 30秒

合成 : 72℃, 1分

これらの各工程では、温度制御とともに、高電圧発生装置6により電極4a、4b間に1本鎖DNAが直線状に

の電圧を印加する。

【0010】PCRは試料の鋳型DNAを複製して増量するものであり、反応溶液としては上記のシーケンス法における反応溶液のうちから、ダイデオキシヌクレオチド三リン酸を除いたものである。シーケンス法ではディネーター、アニーリング及び合成の3工程からなるサイクルを1回のみ行なうが、PCRでは複数サイクルを繰り返す。

【0011】

【発明の効果】本発明ではDNAの複製反応を行なわせる反応溶液中の1本鎖鋳型DNAがその反応溶液に印加された電界により直線状になるので、鋳型DNAとプラ

イマーとのアニーリングやプライマーから塩基配列を伸長させる合成反応が円滑に行なわれるようになり、反応速度が大きくなる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明を実施する反応装置の一例を示す概略斜視図である。

【符号の説明】

2 反応容器

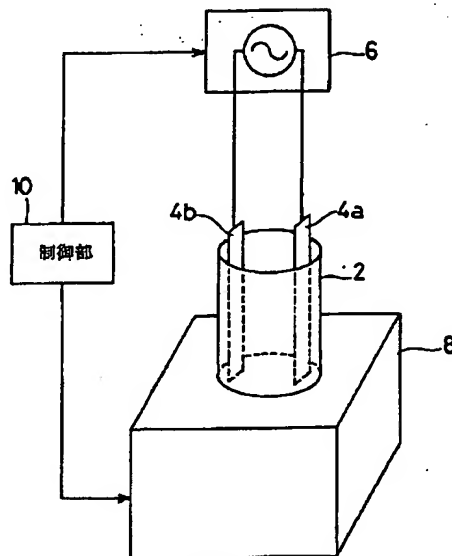
4a, 4b 電極

6 高電圧発生装置

8 温調ブロック

10 制御部

【図1】



THIS PAGE BLANK (USPTO)